

# تأثیر پوشش نگهدارنده خوراکی کیتوزان حاوی اسانس مرزنجوش (*Origanum vulgare* L.) بر ماندگاری ماهی قزل آلاهی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در یخچال

سمیرا جدی<sup>۱</sup>، سکینه یگانه<sup>۲\*</sup>، سید علی جعفرپور<sup>۲</sup>، محمود ناصری<sup>۳</sup>

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۲- دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۳- دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۰۳

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۴/۲۶

## چکیده

به منظور افزایش کیفیت و ماندگاری مواد غذایی روش‌های مختلفی در صنایع غذایی به کار می‌رود، در این تحقیق اثر پوشش نگهدارنده خوراکی کیتوزان و اسانس مرزنجوش بر شاخص‌های شیمیایی و میکروبی فیله قزل آلاهی رنگین کمان در دمای ۴ درجه سانتی گراد مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور، محلول آبی کیتوزان ۲ درصد در دو تیمار فاقد اسانس مرزنجوش و ۰/۵ درصد اسانس آماده شده و نمونه‌های فیله در محلول‌های تهیه شده غوطه‌ور شده و سپس در دمای  $4 \pm 1$  درجه سانتی گراد قرار گرفتند. فیله‌های بدون محافظ (شاهد) و فیله‌های دارای پوشش با فاصله زمانی ۷ روزه (روزهای صفر، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز) مورد آزمایش‌های شیمیایی (TVN, TBA, PV) و میکروبی (باکتری‌های سرماگرا و سودوموناس‌ها) قرار گرفتند. در بررسی نتایج مشخص شد که نمونه‌های پوششی کیتوزان دارای اسانس مرزنجوش، بار باکتریایی و شاخص‌های فساد کمتری را نشان داده و اثر بازدارندگی بهتری نشان دادند و بعد از آن تیمار پوششی ۲ درصد کیتوزان قرار داشت. با توجه به نتایج این تحقیق به دلیل محدودیت استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی و تمایل مصرف کنندگان به آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌توان ۰/۵ درصد اسانس مرزنجوش را به عنوان یک آنتی‌اکسیدان موثر همراه با پوشش کیتوزان جهت افزایش ماندگاری فیله ماهی قزل آلاهی رنگین کمان در دمای ۴ درجه سانتی-گراد معرفی نمود.

**واژه‌های کلیدی:** قزل آلاهی رنگین کمان، کیتوزان، اسانس مرزنجوش، ماندگاری

## ۱- مقدمه

منابع پروتئین دریایی به عنوان یکی از مهم ترین اقلام تأمین کننده پروتئین حیوانی در سبد غذایی ملت ها، سابقه بس طولانی دارد. گوشت ماهی با دارا بودن اسیدهای چرب غیراشباع نوع امگا-۳ و همچنین اسیدهای آمینه ضروری با قابلیت هضم بالا، کلسیم، فسفر و ویتامین های محلول در چربی، منبع غذایی سالمی در رژیم غذایی جوامع شهری محسوب می شود. قزل آلائی رنگین کمان دارای ارزش غذایی بالایی بوده و تولید آن از دهه ۱۹۵۰ به طور تصاعدی در سراسر دنیا، افزایش یافته است. بر اساس سالنامه آماری سازمان شیلات ایران میزان تولید این ماهی به بیش از ۱۳۱۰۰۰ تن در سال ۱۳۹۱ و به ۱۴۰۰۰۰ تن در سال ۱۳۹۲ در کشور رسیده است (۱). از آنجایی که محصولات غذایی در مناطقی دورتر از محل تولیدشان به فروش می رسند، لازم است که عمر ماندگاری این محصولات افزایش یابد (۱۰). برای افزایش ماندگاری مواد غذایی روش های سنتی مختلفی در صنایع غذایی بکار می رود، برای مثال نگهداری در سرما و یا به صورت منجمد روش مناسبی برای نگهداری ماهیان است، اما نمی تواند به طور کامل مانع واکنش های میکروبی و شیمیایی که منجر به کاهش کیفیت ماهی می شوند، گردد (۱۷). ترکیبات فرار حاصل از اکسیداسیون و واکنش هیدرولیتیک چربی ها (هیدروپراکسیدها، آلدئیدها، کتون ها، اسیدهای چرب و...) مشخصات بو، طعم، رنگ، بافت، ارزش غذایی و به طور کلی کیفیت ماهی را دستخوش تغییر می کنند و باعث عدم مطلوبیت برای مصرف کنندگان می شوند (۲۳). از این رو برای بهبود کیفیت و افزایش ماندگاری این فرآورده ها در مدت نگهداری، به طور متداول، آنتی اکسیدان هایی مانند هیدروکسی آنیزول بوتیل<sup>۱</sup> و هیدروکسی تولوئن بوتیل<sup>۲</sup> عوامل کلاته کننده و ترکیبات ضد میکروبی مورد استفاده قرار می گیرند (۱۷). اما امروزه با توجه به وجود عوارض استفاده از آنتی اکسیدان های مصنوعی اثرات نامطلوب آن ها

مانند اثر جهش زایی، ایجاد مسمومیت و سرطان زایی استفاده از آنتی اکسیدان های طبیعی مانند ترکیبات پلی فنل موجود در گیاهان که آثار محافظتی در برابر بیماری های مزمن، سرطان، بیماری های قلبی- عروقی و جهش زایی دارند، توصیه می شود (۲۵). از آنجایی که مهم ترین دلیل فساد، رشد میکروبی روی سطح فرآورده غذایی است، به کار بردن عوامل ضد میکروبی در بسته بندی می تواند سبب به تأخیر انداختن یا حتی جلوگیری از رشد میکروارگانیسم های عامل فساد شده و در نتیجه باعث افزایش مدت زمان ماندگاری و بهبود ایمنی فرآورده ی غذایی شود (۱۱). فیلم های ضد میکروبی می توانند مدت زمان ماندگاری غذا و سلامت آن را از طریق ممانعت رشد میکروارگانیسم های بیماری زا و عامل فساد با افزایش فاز تأخیری و یا کاهش سرعت رشد آن ها، افزایش دهند. از طرفی قابلیت فیلم ها و پوشش های خوراکی برای کند کردن نفوذ رطوبت، اکسیژن، مواد فرار و محلول را می توان با افزودن موادی مانند آنتی اکسیدان ها، مواد ضد میکروبی، موادرنگی، طعم دهنده ها، ادویه ها و ... در ساختار فیلم، افزایش داد (۲). مبارزه با مشکل افزایش زباله های ناشی از مواد بسته بندی، اخیراً مطالعات در زمینه ی به کارگیری فیلم ها و پوشش های خوراکی ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی که موادی زیست تخریب پذیر و سازگار با محیط زیست هستند را افزایش داده است (۲). کیتوزان یکی از بهترین زیست بسپارهایی است که تاکنون برای تهیه فیلم ها و پوشش های خوراکی به کار رفته است. که از N- استیل-زدایی قلیایی جزئی کیتین به دست می آید، کیتین عموماً در اسکلت خارجی یا محافظ پوشش سخت پوستان دریایی یافت می شود، این ماده به عنوان یک منبع مهم تجدید پذیر و دومین پلیمر زیستی طبیعی فراوان بعد از سلولز است (۳۸). در مولکول کیتوزان تعداد زیادی گروه های آمین و هیدروکسید وجود دارد. این ساختار منجر به توانایی بالقوه کیتوزان در تشکیل کمپکس های قوی با فلزات می شود (۴۳). توانایی کیتوزان در اتصال به یون های فلزی مانند مس، کروم، روی، وانادیوم و آهن به اثبات رسیده است (۲۴). کیتوزان به دلیل خواص تشکیل روکش و خواص منحصربه فرد افزایش ویسکوزیته به محض آبگیری، قابلیت

## ۲- مواد و روشها

### ۲-۱- تهیه محلول کیتوزان و کیتوزان حاوی اسانس

#### مرزنجوش

کیتوزان به شکل پودر (شرکت سیگما) تهیه شد و اسانس مرزنجوش از شرکت گیاه-اسانس گرگان خریداری شد. پس از تهیه محلول ۱٪ حجمی - حجمی اسیداستیک، ۰/۲ گرم از کیتوزان با جرم مولکولی پائین به ۱۰۰ سی سی محلول اسیداستیک یک درصد اضافه شده، سپس به تدریج ۲ گرم کیتوزان با جرم مولکولی بالا به محلول اسیداستیک در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد افزوده شد و عمل هم زدن به آرامی انجام شد تا کیتوزان به طور کامل حل شود. پس از ۳ ساعت کیتوزان در اسیداستیک حل شده و محلولی به رنگ قهوه‌ای کم‌رنگ تشکیل گردید. در این مرحله گلیسرول به میزان ۱/۵ سی سی به عنوان نرم کننده افزوده شد، بعد از ۳۰ دقیقه محلول مورد نظر به دلیل وجود ناخالصی با کاغذ واتمن ۳ تحت خلاء صاف گردید. قبل از افزودن اسانس، توئین ۸۰ به عنوان امولسی‌فایر به میزان ۰/۰۲ درصد به محلول کیتوزان اضافه شده و جهت پخش یکنواخت امولسی‌فایر درون محلول هم‌زدن تا ۳۰ دقیقه ادامه یافت. در نهایت محلول به-عنوان فیلم پوشش‌دهنده مورد استفاده قرار گرفت (۳۳). محلول کیتوزان - مرزنجوش با افزودن مقدار ۰/۵ درصد از اسانس مرزنجوش به محلول پایه کیتوزان تهیه شد.

### ۲-۲- آماده‌سازی نمونه

ماهی قزل‌آلا با وزن حدود ۴۰۰-۵۵۰ گرم بعد از خرید از مزرعه پرورش قزل‌آلا در شیراز با جعبه‌های محتوی یخ به آزمایشگاه منتقل شد. پس از سر و دم‌زنی و جداسازی پوست و استخوان در دمای اتاق از هر ماهی ۲ فیله تهیه شد. بخشی از فیله‌ها بدون محافظ (شاهد) و بخشی، با محلول کیتوزان ۲ درصد و محلول کیتوزان ۲ درصد و اسانس ۰/۵ درصد تیمار شده و به روش غوطه‌وری در محلول قرار داده شد، از محلول خارج شده و به مدت چند دقیقه در مجاورت هوا قرار گرفت تا فیلم نگهدارنده روی فیله تشکیل شود پس از شکل‌گیری پوشش‌ها هر تیمار سه تکرار تهیه شد (۲). سپس نمونه‌ها در یخچال نگهداری شده و آزمایش‌های زیر

استفاده در بسته‌بندی مواد غذایی به‌ویژه به‌عنوان پوشش و یا روکش خوراکی را دارا است. برای روکش‌های کیتوزان تعدادی از خواص کاربردی شامل: خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و نفوذناپذیری در برابر عبور اکسیژن گزارش شده است (۴۲). استفاده از اسانس‌های طبیعی به دلیل محتوای گروه‌هایی از ترکیبات پلی‌فنلیک به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند، از تشکیل رادیکال‌های آزاد جلوگیری کرده و موجب حفظ ویژگی‌های گوشت ماهی می‌شود. گیاه (*Origanum vulgare L.*) با نام مرزنجوش وحشی یا اروپایی که در ایران نیز پراکنش وسیعی یافته است، گیاهی معطر از خانواده‌ی نعنائیان (*Labiatae*) می‌باشد، که از دیرباز در غذاهای سنتی به‌عنوان عطر و طعم‌دهنده و در طب سنتی به‌عنوان گیاه دارویی پرخاصیت کاربرد فراوانی دارد. مطالعات محققان مختلف نشان داده است که اسانس این گیاه، دارای فعالیت‌های ضد میکروبی و ضد اکسیدانی می‌باشد (۱۳، ۱۴، ۱۵). ترکیبات مؤثره‌ی موجود در اسانس مرزنجوش وحشی ترکیبات فنلی تیمول، کارواکرول، رزمارینیک اسید و ترپنوئیدهای تقویت‌کننده‌ی اثر آن‌ها ارتوسایمن، گاماترپین و لینالول می‌باشد که محققان بیشترین عملکرد آنتی‌باکتریالی و آنتی‌اکسیدانی آن را به تیمول و کارواکرول نسبت داده‌اند (۱۲). اثر آنتی-میکروبی اسانس این گیاه بر تعداد زیادی از باکتری‌ها به‌ویژه باکتری‌های پاتوژنیک و مولد فساد در مواد غذایی به اثبات رسیده است (۹، ۲۷، ۳۵). مطالعاتی در ارتباط با تأثیر فیلم پوششی کیتوزان (۲، ۶، ۴۲، ۱۷، ۷، ۴۰) و اسانس‌های گیاهی مرزنجوش (۴۵) به‌طور مجزا در ماندگاری انواعی از ماهیان انجام شده است، اما تحقیقی در ارتباط استفاده از این دو به صورت مکمل انجام نشده است. لذا به منظور افزایش فرهنگ تازه‌خوری فرآورده‌های شیلاتی، هدف از این مطالعه بررسی کارآیی استفاده از پوشش نگهدارنده کیتوزان حاوی اسانس مرزنجوش در بهبود ماندگاری ماهی قزل‌آلا و رنگین کمان در طول دوره نگهداری در یخچال می‌باشد.

لوله‌ها در بن‌ماری با دمای ۹۵°C، به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند. سپس در دمای محیط سرد شدند و بعد با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، میزان جذب (As) آنها در ۵۳۰ نانومتر در مقابل شاهد آب مقطر (Ab) خوانده شد. با استفاده از رابطه زیر، میزان TBA (بر حسب میلی‌گرم مالون دی‌آلدئید در هر کیلوگرم از بافت ماهی) مورد محاسبه قرار گرفت (۳۱).

$$TBA = \frac{(As - Ab) \times 50}{200}$$

۳-۳-۲- اندازه‌گیری بازهای از ته فرار (TVB-N):  
ابتدا ۱۰ گرم از گوشت میکس شده ماهی و ۲ گرم اکسید منیزیم در یک بالون کلدال توزین شد. سپس ۳۰۰ سی‌سی آب مقطر، ۲ تا ۳ قطره اکتانول (به‌عنوان ضد کف) و تعدادی ساچمه شیشه‌ای نیز به محتویات بالن افزوده شد. سپس سیستم کلدال نصب‌شده و در زیر لوله خروجی سیستم، ارلنی حاوی ۲۵ سی‌سی اسیدبوریک ۲ درصد دارای ۳-۲ قطره معرف متیل‌رد قرار گرفت به‌طوری‌که سر لوله خروجی کاملاً درون محلول ارلن بود تا پس از برقراری جریان آب سرد و روشن کردن هیتر و جوشیدن محتویات بالن کلدال، گازهای متصاعدشده که معرف بازهای از ته فرار هستند در محلول درون ارلن جمع‌آوری شوند که به‌صورت تغییر رنگ محلول از ارغوانی به سبز روشن نمودار شد. درنهایت این محلول با اسیدسولفوریک ۰/۱ نرمال تیترو شد تا رنگ محلول مجدداً ارغوانی شود. با قرار دادن میزان اسید مصرفی جهت تیتراسیون در رابطه زیر، بازهای از ته فرار برحسب میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهی محاسبه شد (۲۰).

$$TVB-N = 14 \times \text{حجم اسیدسولفوریک مصرفی}$$

در فواصل زمانی صفر، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز روی ماهی‌های تیمار و شاهد انجام گرفت.

### ۳-۲- آزمایش‌های شیمیایی

#### ۳-۲-۱- اندازه‌گیری پراکسید (PV)<sup>۲</sup>

۱۵ گرم از گوشت بدون استخوان ماهی خوب میکس شده، در دکانتور قرار داده شد، سپس ۶۰ سی‌سی کلروفرم (شارلو) و بعد ۶۰ سی‌سی متانول (مرک) به آن افزوده شد. پس از ۱۲-۲۴ ساعت، ۳۶ سی‌سی آب مقطر به نمونه افزوده شده و به مدت ۱-۲ ساعت استراحت داده شد تا ۳ فاز تشکیل شود. با دقت، ۲۰ سی‌سی از فاز پایین، درون ارلن انتقال یافته، ۲۵ سی‌سی اسیداستیک (Applichem) کلروفرمی (نسبت کلروفرم به اسیداستیک ۳:۲) به آن افزوده شد. سپس ۰/۵ سی‌سی محلول یدور پتاسیم (مرک) اشباع، ۳۰ سی‌سی آب مقطر به محتویات ارلن اضافه شده، به مدت ۱ دقیقه استراحت داده شد و بعد مقدار ۰/۵ سی‌سی معرف نشاسته ۱٪ به آن افزوده شد و درب ارلن را گذاشته، محلول به شدت تکان داده شد. ید آزاد شده، باعث تغییر رنگ محلول شد که با محلول تیوسولفات ۰/۰۱ نرمال (مرک)، تیترو شد (۱۶). سپس با استفاده از رابطه زیر، میزان پراکسید محاسبه گردید.

$$PV = \frac{100 \times \text{نرمالینه} \times \text{حجم مصرفی تیوسولفات}}{\text{وزن نمونه روغن}}$$

#### ۳-۲-۲- اندازه‌گیری تیوباریتوریک اسید (TBA)<sup>۴</sup>

۲۰۰ میلی‌گرم از نمونه گوشت میکس شده، به بالن ۲۵ سی‌سی انتقال یافته، با ۱- بوتانول به حجم رسانده شد. ۵ سی‌سی از این محلول به لوله فالکون خشک درب‌دار انتقال یافت و ۵ سی‌سی معرف TBA (که از انحلال ۲۰۰ میلی‌گرم پودر TBA در ۱۰۰ سی‌سی حلال ۱-بوتانول و صاف کردن بوسیله کاغذ صافی به دست آمد) به آن افزوده شد. بعد

Peroxide value

<sup>4</sup>Thiobarbituric acid

Total volatile basic nitrogen

**۲-۳-۴- شمارش باکتری‌های سرماگرا (TPC)**

برای شمارش باکتری‌های سرماگرا (TPC) از نمونه‌های تهیه‌شده، از محیط تریپتیک سوی آگار (TSA) استفاده شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های تهیه‌شده، بر روی محیط کشت به‌طور سطحی پخش شده و پلیت‌های مربوط به باکتری‌های سرماگرا بعد از ۱۰ روز انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتی-گراد شمارش شدند (۲۸).

**۲-۳-۵- شمارش سودوموناس‌ها<sup>۲</sup>**

برای شمارش سودوموناس‌ها از محیط کشت ستریمید آگار استفاده‌شده و از رقت‌های تهیه‌شده مقداری مشخصی از آن به‌صورت سطحی در محیط کشت ستریمید آگار کشت داده شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت انکوبه شد. باکتری‌های رشدیافته بر روی محیط نشان‌دهنده‌ی جنس سودوموناس بودند (۲۸).

**۲-۴- تجزیه و تحلیل آماری**

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تیمار و هر تیمار سه تکرار انجام شد. به منظور تجزیه و تحلیل مقادیر کمی به دست آمده از آزمایش‌ها پس از کنترل نرمال بوده داده‌ها با استفاده از آزمون (Shapiro-Wilk) به‌صورت آزمایش فاکتوریل با بررسی اثر اسانس مرزنجوش-کیتوزان در سه سطح (صفر-صفر، صفر-۲ درصد و ۰/۵-۲ درصد) و در ۴ زمان (صفر، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز) به روش آنالیز واریانس دوطرفه (Two-Way ANOVA) انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون آماری دانکن در سطح احتمال ۹۵ درصد استفاده شد. از نرم‌افزار SPSS ۲۲ برای آنالیز آماری و از نرم‌افزار Excel برای رسم نمودارها استفاده گردید.

**۳- نتایج****۳-۱- پراکسید**

میزان پراکسید با افزایش زمان نگهداری در همه تیمارها افزایش یافت ( $P < 0/05$ )، جدول ۱)، به‌طوری‌که میزان

پراکسید از  $0/02 \pm 0/86$  در زمان صفر نگهداری تا  $0/2 \pm 0/56$  میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم چربی در روز ۱۴ نگهداری، در تیمار شاهد افزایش یافت و در تیمارهای پوششی کیتوزان و کیتوزان-اسانس از  $0/00 \pm 0/86$  و  $0/01 \pm 0/88$  در زمان صفر نگهداری به  $0/12 \pm 0/23$  و  $0/03 \pm 0/78$  در روز ۱۴ نگهداری، افزایش یافت. میزان پراکسید تیمارهای مختلف در روز صفر نگهداری فاقد اختلاف معنی‌دار بودند ( $P > 0/05$ )، اما با گذشت ۲۱ روز نگهداری، عدد پراکسید تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها از خود نشان داد، به‌طوری‌که میزان پراکسید در تمامی زمان‌های نگهداری در تیمار پوششی کیتوزان-اسانس مرزنجوش کمترین میزان را نشان داد و بعد از آن تیمار پوششی کیتوزان قرار داشت ( $P < 0/05$ ). آنالیز واریانس دو طرفه نشان داد که اثر تیمار، زمان و اثر متقابل تیمار و زمان نگهداری بر شاخص پراکسید معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ).

**۳-۲- میزان تیوباریتوریک اسید**

میزان TBA در تمامی تیمارها با افزایش زمان نگهداری به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ( $P < 0/05$ )، جدول ۲)، به‌طوری‌که میزان آن در نمونه‌های شاهد از  $0/01 \pm 0/63$  میلی‌گرم مالون دی‌آلدئید در هر کیلوگرم از بافت ماهی‌در روز صفر نگهداری تا  $0/04 \pm 0/51$ ، در روز ۱۴ نگهداری افزایش یافت، در تیمارهای پوششی کیتوزان و تیمار پوششی کیتوزان-اسانس مرزنجوش این میزان به ترتیب از  $0/01 \pm 0/63$  و  $0/08 \pm 0/63$  میلی‌گرم مالون دی‌آلدئید در هر کیلوگرم از بافت ماهی‌در روز صفر نگهداری تا  $0/22 \pm 0/13$  و  $0/09 \pm 0/24$  در روز ۱۴ نگهداری افزایش یافت. میزان TBA در پایان زمان نگهداری، بین تیمارها تفاوت معنی‌دار داشت ( $P < 0/05$ ). به‌طوری‌که در تیمار پوششی کیتوزان-اسانس مرزنجوش کمترین میزان را نشان داد و بعد از آن تیمار پوششی کیتوزان قرار داشت ( $P < 0/05$ ). در روزهای صفر، ۷ و ۲۱ بین تیمارهای کیتوزان و کیتوزان-اسانس تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ( $p > 0/05$ ). آنالیز واریانس دو طرفه نشان داد که اثر تیمار، زمان و اثر متقابل

Total psychotropic count

Total pseudomonas count

تیمار و زمان نگهداری بر شاخص TBA معنی دار بود ( $P < 0/05$ ).

### ۳-۳- میزان بازهای از ته فرار

میزان TVB-N باگذشت زمان نگهداری به طور معنی داری در همه تیمارها افزایش یافت ( $P < 0/05$ ، جدول ۳)، به طوری که میزاناتان از  $10/34 \pm 0/23$  در زمان صفر نگهداری تا  $38/21 \pm 0/59$  میلی گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهیدر روز ۱۴ نگهداری، در تیمار شاهد افزایش یافت و این میزان در تیمارهای پوششی کیتوزان و کیتوزان-اسانس از  $0/04 \pm 0/17$  و  $10/12 \pm 0/05$  میلی گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهیدر زمان صفر نگهداری به  $26/43 \pm 0/09$  و  $0/62 \pm 23/75$  در روز ۱۴ نگهداری، افزایش یافت. میزان TVB-N در تیمارهای مختلف روز صفر نگهداری فاقد اختلاف معنی دار بودند ( $P > 0/05$ )، اما در سایر روزهای نگهداری تفاوت معنی داری در بین تیمارها از خود نشان داد ( $P < 0/05$ ). به طوری که میزان بازهای از ته فرار در تمامی زمان های نگهداری در تیمار پوششی کیتوزان - اسانس مرزنجوش کمترین میزان را نشان داد و بعد از آن تیمار پوششی کیتوزان قرار داشت. آنالیز واریانس دو طرفه نشان داد که اثر تیمار، زمان و اثر متقابل تیمار و زمان نگهداری بر شاخص TVB-N معنی دار بود ( $P < 0/05$ ).

### ۴-۳- شاخص های میکروبی

#### ۳-۴-۱- باکتری های سرماگرا

میزان باکتری های سرماگرا در طول دوره نگهداری افزایش یافت، همچنین میزان باکتری های سرماگرا در بین تیمارها دارای تفاوت معنی دار بود (جدول ۴،  $P < 0/05$ ). به طوری که

میزان اولیه این باکتری ها در روز صفر نگهداری، برای تیمارهای شاهد (فاقد پوشش)، کیتوزان و کیتوزان-اسانس به ترتیب  $3/63 \pm 0/09$ ،  $3/48 \pm 0/07$  و  $3/41 \pm 0/02$  لگاریتم تعداد کلونی گرم نمونه بود و در روز ۱۴ نگهداری، این میزان در فیله شاهد به  $7/0 \pm 40/06$  لگاریتم تعداد کلونی در گرم نمونه بود و در فیله پوششی کیتوزان به  $6/22 \pm 0/10$  لگاریتم تعداد کلونی در گرم نمونه بود، اما در نمونه پوششی کیتوزان و اسانس مرزنجوش این میزان به  $5/74 \pm 0/08$  لگاریتم تعداد کلونی در گرم نمونه افزایش پیدا کرد. به طوری که نمونه های پوششی با کیتوزان - مرزنجوش بار باکتریایی کمتری داشتند ( $P < 0/05$ ). آنالیز واریانس دو طرفه نشان داد که اثر تیمار، زمان و اثر متقابل تیمار و زمان نگهداری بر شاخص باکتری های سرماگرا معنی دار بود ( $P < 0/05$ ).

#### ۳-۴-۲- باکتری های سودوموناس

در شمارش میزان اولیه این باکتری ها در روز صفر نگهداری در فیله شاهد و فیله های تیمار شده تفاوت معنی داری بین تیمارها مشاهده نشد (جدول ۵،  $P > 0/05$ ). باگذشت زمان تفاوت معنی داری در بین تیمارهای مختلف مشاهده شده به طوری که مقدار سودوموناس ها در روز صفر در فیله قزل-آلای رنگین کمان از  $2/27 \pm 0/16$  لگاریتم تعداد کلونی در گرم نمونه در فیله شاهد تا  $5/88 \pm 0/21$  لگاریتم تعداد کلونی در گرم نمونه در روز ۱۴ افزایش یافت، در حالی که این میزان در تیمار پوششی کیتوزان در روز ۱۴، حدود  $4/91 \pm 0/24$  مشاهده شد و کمترین میزان سودوموناس ها مربوط به تیمار پوششی کیتوزان و اسانس به میزان  $4/31 \pm 0/06$  لگاریتم تعداد کلونی در گرم نمونه بود ( $P < 0/05$ ). آنالیز واریانس دو طرفه نشان داد که اثر تیمار، زمان و اثر متقابل تیمار و زمان نگهداری بر شاخص باکتری های سودوموناس معنی دار بود ( $P < 0/05$ ).

جدول ۱: مقادیر پراکسید (میلی‌اکی‌والان اکسیژن در کیلوگرم چربی) در تیمارهای مختلف فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان (شاهد، فیله با پوشش کیتوزان و فیله با پوشش کیتوزان-اسانس مرزنجوش) در زمان نگهداری در یخچال.

| زمان                    |                         |                          |                         | تیمار            |
|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------|
| روز ۲۱                  | روز ۱۴                  | روز ۷                    | روز صفر                 |                  |
| ۵/۰±۵۶/۰۳ <sup>Cc</sup> | ۵/۰±۵۷/۰۹ <sup>Cd</sup> | ۳/۰±۵۰/۳۸ <sup>Bb</sup>  | ۰/۰±۸۶/۰۲ <sup>Aa</sup> | فاقد پوشش (شاهد) |
| ۴/۰±۱۰/۱۰ <sup>Bc</sup> | ۴/۰±۲۳/۱۲ <sup>Bc</sup> | ۳/۰±۱۷/۰۶ <sup>ABb</sup> | ۰/۰±۸۶/۰۰ <sup>Aa</sup> | کیتوزان          |
| ۳/۰±۵۰/۳۷ <sup>Ac</sup> | ۳/۰±۷۸/۰۳ <sup>Ad</sup> | ۲/۰±۷۸/۳۶ <sup>Ab</sup>  | ۰/۰±۸۸/۰۱ <sup>Ba</sup> | کیتوزان - اسانس  |
| <b>P value</b>          |                         |                          |                         |                  |
|                         |                         |                          |                         | تیمار            |
|                         |                         |                          |                         | زمان             |
|                         |                         |                          |                         | زمان × تیمار     |

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشند. حروف متفاوت کوچک و بزرگ به ترتیب نشان‌دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار در هر سطر و ستون است ( $P < 0/05$ ).

جدول ۲: مقادیر تیوباریتوریک اسید (میلی‌گرم مالون دی‌آلدئید در هر کیلوگرم از بافت ماهی) در تیمارهای مختلف فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان (شاهد، فیله با پوشش کیتوزان و فیله با پوشش کیتوزان-اسانس مرزنجوش) در زمان نگهداری در یخچال.

| زمان                    |                         |                         |                         | تیمار            |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------|
| روز ۲۱                  | روز ۱۴                  | روز ۷                   | روز صفر                 |                  |
| ۵/۰±۵۵/۲۸ <sup>Bd</sup> | ۴/۰±۵۱/۰۴ <sup>Cc</sup> | ۲/۰±۵۰/۰۶ <sup>Ab</sup> | ۰/۰±۶۳/۰۱ <sup>Aa</sup> | فاقد پوشش (شاهد) |
| ۴/۰±۳۷/۰۴ <sup>Ad</sup> | ۳/۰±۱۳/۲۲ <sup>Bc</sup> | ۲/۰±۲۴/۰۳ <sup>Ab</sup> | ۰/۰±۶۳/۰۱ <sup>Aa</sup> | کیتوزان          |
| ۴/۰±۲۸/۰۷ <sup>Ad</sup> | ۲/۰±۲۴/۰۹ <sup>Ac</sup> | ۲/۰±۰۰/۲۳ <sup>Ab</sup> | ۰/۰±۶۳/۰۸ <sup>Aa</sup> | کیتوزان - اسانس  |
| <b>P value</b>          |                         |                         |                         |                  |
|                         |                         |                         |                         | تیمار            |
|                         |                         |                         |                         | زمان             |
|                         |                         |                         |                         | زمان × تیمار     |

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشند. حروف متفاوت کوچک و بزرگ به ترتیب نشان‌دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار در هر سطر و ستون است ( $P < 0/05$ ).

جدول ۳: مقادیر بازهای ازته فرار (میلی گرم نیتروژندر ۱۰۰ گرم نمونه ماهی) در تیمارهای مختلف فیله قزل آلالی رنگین کمان (شاهد، فیله با پوشش کیتوزان و فیله با پوشش کیتوزان-اسانس مرزنجوش) در زمان نگهداری در یخچال.

| زمان                     |                          |                          |                          | تیمار            |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------|
| روز ۲۱                   | روز ۱۴                   | روز ۷                    | روز صفر                  |                  |
| ۶۴/۱±۲۲/۵۳ <sup>Cd</sup> | ۳۸/۰±۲۱/۵۹ <sup>Cc</sup> | ۲۰/۰±۷۶/۵۹ <sup>Cb</sup> | ۱۰/۰±۳۴/۲۳ <sup>Aa</sup> | فاقد پوشش (شاهد) |
| ۳۸/۲±۹۲/۴۹ <sup>Bd</sup> | ۲۶/۰±۴۳/۰۹ <sup>Bc</sup> | ۱۶/۰±۸۶/۱۸ <sup>Bb</sup> | ۱۰/۰±۱۷/۰۴ <sup>Aa</sup> | کیتوزان          |
| ۳۴/۱±۰۱/۸۰ <sup>Ad</sup> | ۲۳/۰±۷۵/۶۲ <sup>Ac</sup> | ۱۴/۰±۲۲/۱۱ <sup>Ab</sup> | ۱۰/۰±۱۲/۰۵ <sup>Aa</sup> | کیتوزان - اسانس  |
| <b>P value</b>           |                          |                          |                          |                  |
|                          |                          |                          |                          | تیمار            |
|                          |                          |                          |                          | زمان             |
|                          |                          |                          |                          | زمان × تیمار     |

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشند. حروف متفاوت کوچک و بزرگ به ترتیب نشان‌دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار در هر سطر و ستون است ( $P < 0.05$ ).

جدول ۴: میزان باکتری‌های سرماگرا (لگاریتم تعداد کلونی در گرم نمونه) در تیمارهای مختلف فیله قزل آلالی رنگین کمان (شاهد، فیله با پوشش کیتوزان و فیله با پوشش کیتوزان-اسانس مرزنجوش) در زمان نگهداری در یخچال.

| زمان                    |                         |                         |                         | تیمار            |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------|
| روز ۲۱                  | روز ۱۴                  | روز ۷                   | روز صفر                 |                  |
| ۹/۰±۴۰/۱۶ <sup>Cd</sup> | ۷/۰±۴۰/۰۶ <sup>Cc</sup> | ۵/۰±۶۲/۱۲ <sup>Cb</sup> | ۳/۰±۶۳/۰۹ <sup>Ba</sup> | فاقد پوشش (شاهد) |
| ۷/۰±۴۶/۱۰ <sup>Bd</sup> | ۶/۰±۲۲/۱۰ <sup>Bc</sup> | ۴/۰±۳۹/۰۷ <sup>Bb</sup> | ۳/۰±۴۸/۰۷ <sup>Aa</sup> | کیتوزان          |
| ۶/۰±۹۹/۱۴ <sup>Ad</sup> | ۵/۰±۷۴/۰۸ <sup>Ac</sup> | ۴/۰±۰۹/۰۲ <sup>Ab</sup> | ۳/۰±۴۱/۰۲ <sup>Aa</sup> | کیتوزان - اسانس  |
| <b>P value</b>          |                         |                         |                         |                  |
|                         |                         |                         |                         | تیمار            |
|                         |                         |                         |                         | زمان             |
|                         |                         |                         |                         | زمان × تیمار     |

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشند. حروف متفاوت کوچک و بزرگ به ترتیب نشان‌دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار در هر سطر و ستون است ( $P < 0.05$ ).



جدول ۵: میزان باکتری‌های سودوموناس (لگاریتم تعداد کلونی در گرم نمونه) در تیمارهای مختلف فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان (شاهد، فیله با پوشش کیتوزان و فیله با پوشش کیتوزان-اسانس مرزنجوش) در زمان نگهداری در یخچال.

| تیمار            | زمان                    |                          |                         |                         |
|------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                  | روز صفر                 | روز ۷                    | روز ۱۴                  | روز ۲۱                  |
| فاقد پوشش (شاهد) | ۲/۰±۲۷/۱۶ <sup>Aa</sup> | ۴/۰±۶۹/۱۳ <sup>Bb</sup>  | ۵/۰±۸۸/۲۱ <sup>Cd</sup> | ۸/۰±۱۰/۲۴ <sup>Bd</sup> |
| کیتوزان          | ۲/۰±۲۱/۰۴ <sup>Aa</sup> | ۳/۰±۳۷/۰۵ <sup>ABb</sup> | ۴/۰±۹۱/۲۴ <sup>Bc</sup> | ۶/۰±۵۱/۰۸ <sup>Ad</sup> |
| کیتوزان-اسانس    | ۲/۰±۲۵/۰۴ <sup>Aa</sup> | ۳/۰±۲۰/۰۶ <sup>Ab</sup>  | ۴/۰±۳۱/۰۶ <sup>Ad</sup> | ۶/۰±۲۶/۰۳ <sup>Ad</sup> |
| <b>P value</b>   |                         |                          |                         |                         |
| تیمار            | ۰۰۰                     |                          |                         |                         |
| زمان             | ۰۰۰                     |                          |                         |                         |
| زمان × تیمار     | ۰۰۰                     |                          |                         |                         |

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشند. حروف متفاوت کوچک و بزرگ به ترتیب نشان‌دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار در هر سطر و ستون است ( $P < 0.05$ ).

#### ۴- بحث

##### ۴-۱- پراکسید

پیشرفت تندشدن در ماهی ناشی از اکسیداسیون چربی‌های موجود در بافت‌ها است. اندازه‌گیری پراکسید جهت تعیین محصولات اولیه اکسیداسیون چربی (هیدروپراکسیدها) به کار می‌رود و تولید آن تغییری در ویژگی‌های حسی ماهی ایجاد نمی‌کند، اما ممکن است منجر به ایجاد مخاطراتی برای مصرف‌کننده گردد (۳۴). در این مطالعه مقدار پراکسید در روز صفر در همه تیمارها ناچیز بود و با گذشت زمان در همه تیمارها افزایش یافت. میزان پراکسید در بین تیمار شاهد و تیمار پوششی کیتوزان ۲ درصد و تیمار پوششی کیتوزان ۲ درصد و اسانس ۰/۵ درصد به‌جز روز صفر در سایر روزها تفاوت معنی‌داری داشتند ( $P < 0.05$ ). افزایش مقادیر پراکسید حاکی از توسعه تندی و فساد در طول زمان نگهداری ماهیان در یخچال بوده و کاهش آن در انتهای دوره نگهداری احتمالاً به دلیل پیروی از مکانیسم مونومولکولار و بی‌مولکولار و تبدیل پراکسید به ترکیبات ثانویه اکسیداسیونی (کربونیل‌ها و ترکیبات فرار) می‌باشد. واکنش‌های ثانویه اکسیداسیون از جمله واکنش با پروتئین‌های قابل‌حل در نمک و تولید ترکیبات کربونیلی نظیر استالیدی، پروپونالیدی، استون و اسیدهای چرب فرار نظیر اسید کاپروئیک، اسید پروپونیک و گازهای فرار نیز

می‌توانند دلایل چنین کاهش‌ی باشند (۳). در بین تیمارهای مورد مطالعه، تیمار شاهد بیشترین میزان پراکسید را از خود نشان داد و کمترین میزان پراکسید در روز ۲۱ مربوط به تیمار پوششی کیتوزان - اسانس، در زمان نگهداری در یخچال بود. زرگر و همکاران (۱۳۹۰)، در مطالعه‌ای به بررسی تأثیر پوشش نگهدارنده خوراکی کازئینات سدیم غنی‌شده با اسانس آویشن شیرازی (با غلظت صفر، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد) بر کیفیت و ماندگاری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نگهداری‌شده در یخچال پرداختند (۴). طبق نتایج به‌دست‌آمده در پایان مدت ذخیره‌سازی نمونه‌های دارای اسانس با تفاوت معنی‌دار دارای سطح پایین‌تری از پراکسید نسبت به دو تیمار شاهد و کازئینات سدیم بودند ( $P < 0.05$ ) Ozogul و Uçar (۲۰۱۳)، در بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریایی عصاره‌های مرزنجوش، چای سبز، مریم‌گلی و برگ‌بو با دوز ۰/۳ و ۰/۶ درصد بر کیفیت برگر ماهی منجمد ماکرل (*Scomber japonicus*) دریافتند که تمام عصاره‌ها به‌جز عصاره مریم‌گلی مانع از اکسیداسیون برگر ماهی شده و پس از ۶ ماه از ذخیره‌سازی، تفاوت معنی‌دار در میزان پراکسید در هر دو غلظت از عصاره‌ها به‌جز عصاره برگ‌بو و مریم‌گلی مشاهده شد (۳۶). مطالعات محققان مختلف نشان داده است که اسانس گیاه مرزنجوش، دارای فعالیت‌های آنتی‌میکروبی و آنتی

بازده محصول بیشتری نسبت به فیله های فاقد پوشش نشان دادند.

#### ۴-۲- تیوباریتوریک اسید

تیوباریتوریک اسید به طور گسترده به عنوان شاخص میزان کسیداسیون ثانویه چربی مورد استفاده قرار می گیرد و ناشی از وجود مواد واکنش دهنده با TBA حاصل از مرحله دوم اتواکسیداسیون است که طی آن، پراکسید اب هموادی مثل آلدئیدها و کتون ها اکسید می شوند (۱۸). طبق گزارش Aubourg (۲۰۰۱) از آنجا که مالون آلدئیدها می توانند با سایر ترکیبات بدن ماهی واکنش دهند، مقدار TBA ممکن است نشان دهنده درجه واقعی اکسید شدن چربی ها نباشد. چنین ترکیباتی می توانند شامل آمین ها، نوکلئوتیدها و اسید نوکلئیک، پروتئین ها، فسفولیپیدها و دیگر آلدئیدهای تولیدی در پایان اکسیداسیون چربی باشند. چنین رویکردی در بسیاری از ماهیان دیده شده است (۴۱). در این تحقیق میزان اولیه TBA،  $0/63$  میلی گرم مالون دی آلدئید در هر کیلوگرم از بافت ماهی بود، در تمامی تیمارها با افزایش زمان نگهداری به طور معنی داری افزایش یافت به طوری که میزان آن در روز ۱۴ نگهداری در یخچال در نمونه های شاهد، کیتوزان و کیتوزان-اسانسبه- ترتیب  $0/04 \pm 4/51$ ،  $0/22 \pm 3/13$  و  $0/09 \pm 2/24$  میلی گرم مالون دی آلدئید در هر کیلوگرم از بافت ماهی به دست آمد. روند افزایش این شاخص در طول مدت نگهداری ممکن است به دلیل افزایش آهن آزاد و دیگر پراکسیدان ها در ماهیچه باشد، روند افزایشی هیدروپراکسیدها نیز می تواند دلیلی بر این امر باشد (۱۹). در تمامی زمان های نگهداری تیمار پوششی کیتوزان - اسانس مرزنجوش کمترین میزان TBA را نشان داد و بعد از آن تیمار پوششی کیتوزان قرار داشت که باعث کاهش میزان TBA نسبت به تیمار شاهد (فیله بدون محافظ) در طی ۲۱ روز نگهداری در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  شد. اما با این وجود کاهش میزان تیوباریتوریک اسید در بعضی از روزهای نگهداری ممکن است به دلیل کاهش هیدروپراکسیدها و واکنش بین مالون آلدئید با انواع ترکیبات یا اجزاء موجود در عضلات از جمله پروتئین ها، اسیدهای

اکسیدانی می باشد (۱۳، ۱۴، ۱۵). بیشترین عملکرد آنتی-باکتریایی و آنتی اکسیدانی آن را به تیمول و کارواکرول نسبت داده اند (۱۲، ۴۴). بررسی پوشش خوراکی کیتوزان ۱ و ۲ درصد تغییرات کیفیت روغن ساردین در شرایط سرد نشان داد که پوشش های خوراکی کیتوزان در مهار رشد باکتریها مؤثر بوده و تشکیل TVB-N و فرایندهای اکسیداسیون را به طور معنی داری کاهش دادند (۳۰). اجاق و همکاران (۱۳۸۹)، در مطالعه ای تأثیر استفاده از پوشش نگهدارنده کیتوزان (۲ درصد) غنی شده با اسانس دارچین (صفر، ۰/۴، ۰/۸، ۱/۵ و ۲ درصد) را بر کیفیت و ماندگاری فیله سرد شده ماهی قزل آلا ی رنگین کمان در یخچال مورد بررسی قرار دادند (۲)، آنالیزهای میکروبی، مکانیکی و فیزیکی در فواصل زمانی ۴ روز تا روز ۱۶ نشان داد که تیمارهای پوششی مخصوصا تیمارهای با پوشش اسانس تفاوت معنی داری با تیمار شاهد داشت، بنابراین مشخص شد افزایش اسانس به کیتوزان به عنوان پوشش خوراکی موجب بهبود عملکرد این پوشش بر ماندگاری قزل آلا ی رنگین کمان شد. Jeon و همکاران (۲۰۰۲)، اثر کیتوزان با ۳ و اسکوزیته متفاوت ۱۴، ۵۷ و ۳۶۰ سانتی پوآز با وزن مولکولی متناظر ۶۶۰، ۹۶۰ و ۱۸۰۰ کیلو دالتون را در افزایش ماندگاری فیله های ماهی کاد اطلسی *Gadus morhua* هرینگ *Clupea harengus* تا پایان ۱۲ روز نگهداری در دمای یخچال مطالعه کردند (۲۴). پوشش کیتوزانی به شکل معنی داری اکسیداسیون چربی، فساد شیمیایی و رشد میکروارگانیسم ها را در هر دو ماهی در مقایسه با نمونه های فاقد پوشش، کاهش داد Sathivel و همکاران (۲۰۰۷)، در بررسی اثرات کیتوزان به عنوان پوشش خوراکی بر کیفیت فیله های سالمون صورتی پوست زردایی- شده (*Oncorhynchus gorbucha*) در طی ۳ و ۸ ماه نگهداری در انجماد، گزارش کردند که پوشش های کیتوزانی از کاهش رطوبت فیله ها به میزان حدود ۵۰ درصد در مقایسه با فیله های فاقد پوشش (شاهد) جلوگیری کرده و در تأخیر اکسیداسیون چربی مؤثر بودند (۴۲). همچنین فیله های پوشش داده شده با کیتوزان پس از انجماد زدایی

## ۳-۴- بازهای از ته فرار

TVB-N از ترکیبات مختلف از جمله آمونیاک، متیل آمین، دی متیل آمین و همچنین تری متیل آمین تشکیل شده است که محصولات به دست آمده از فعالیت باکتری های عامل فساد و آنزیم های درونی است (۳۹) و اغلب به عنوان یک شاخص برای فساد ماهی استفاده می شود. Özyurt و همکاران (۲۰۰۹) ماهی و محصولات ماهی را بر اساس شاخص TVB-N به چهار گروه شامل ۱- تا ۲۵ میلی گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهی: کیفیت عالی، ۲- تا ۳۰ میلی گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهی: کیفیت خوب، ۳- تا ۳۵ میلی گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهی: محدودیت مصرف، ۴- بالای ۳۵ میلی گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهی: فاسد طبقه بندی کردند (۳۷). نویسندگان مختلف گزارش کرده اند که حد قابل قبول برای ماهی تازه، ۳۰ میلی- گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهی است (۲۲). در تحقیق حاضر میزان بازهای از ته فرار با گذشت زمان نگهداری در همه تیمارها افزایش یافت، به طوری که میزان بازهای از ته فرار از  $0.23 \pm 10.34$  میلی گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهیدر زمان صفر نگهداری تا  $0.59 \pm 38.21$  در روز ۱۴ نگهداری، در تیمار شاهد افزایش یافت و این میزان در تیمارهای پوششی کیتوزان و کیتوزان - اسانس از  $0.04 \pm 10.17$  و  $0.05 \pm 10.12$  میلی گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهیدر زمان صفر نگهداری به  $0.09 \pm 26.43$  و  $0.62 \pm 23.75$  در روز ۱۴ نگهداری، افزایش یافت. در تمامی زمان های نگهداری تیمار پوششی کیتوزان - اسانس مرزنجوش کمترین میزان را نشان داد و تا روز ۱۴ نگهداری در تیمار پوششی کیتوزان و تیمار پوششی کیتوزان - اسانس از سطح قابل قبول بازهای از ته فرار در گوشت ماهی (۳۰ میلی گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهی) فراتر نرفت. مقادیر پائین تر TVB-N در تیمار پوششی حاوی اسانس را می توان به خواص آنتی باکتریایی حاصل از ترکیبات فنلی کارواکرول و تیمول نسبت داد (۴۴). مقدار TVB-N در فیله قزل آلائی رنگین کمان دارای پوشش کازئینات سدیم و کازئینات سدیم حاوی اسانس آویشن در زمان نگهداری در یخچال، کمتر از تیمار فاقد پوشش

آمین و گلیکوژن باشد که علی رغم افزایش فساد ماهی باعث کاهش مقادیر مالون آلدئید و متعاقباً کاهش تیوباریتوریک اسید می شود (۱۹). مقدار TBA در دو تیمار دارای پوشش در طول دوره نگهداری پائین تر از حدی است که در آن طعم فساد مشخص گردد (کمتر از ۵ میلی گرم مالون دی آلدئید در هر کیلوگرم از بافت ماهی). به نظر می رسد استفاده از اسانس های طبیعی مانند مرزنجوش به دلیل محتوای گروه هایی از ترکیبات پلی فنلی که به عنوان آنتی-اکسیدان عمل می کند، از تشکیل رادیکال های آزاد جلوگیری می کند و با نقش محافظتی از اکسیداسیون چربی ها باعث حفظ ویژگی های گوشت ماهی می شود (۱۴). زرگر (۱۳۹۳) با بررسی تأثیر پوشش نگهدارنده خوراکی کازئینات سدیم غنی شده با اسانس آویشن شیرازی (صفر، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد) بر کیفیت و ماندگاری ماهی قزل آلائی رنگین کمان نگهداری شده در یخچال نیز مشاهده کردند که در پایان مدت ذخیره سازی، تیمار شاهد بالاترین مقادیر TBA را نسبت به سایر تیمارها داشت و تیمار کازئینات سدیم محتوی ۱٪ اسانس کمترین مقدار را نسبت به سایر تیمارها داشت (۵، ۴). Bensid و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه ای به بررسی اثر عصاره های آویشن، مرزنجوش و میخک بر پارامترهای کیفی ماهی کولی (*Engraulis encrasicolus*) در طول ذخیره سازی در یخ پرداختند (۸). طبق این نتایج مقدار TBA در گروه شاهد، در هر روز از مدت ذخیره سازی بالاتر از ( $P < 0.05$ ) ماهی کولی ذخیره شده در یخ با عصاره مرزنجوش بود، بنابراین مشخص شد، سطوح بالای محتوای کل ترکیبات فنلی عصاره ی پونه کوهی و میخک، می تواند در تأخیر پراکسیداسیون لیپیدی و از این رو به دست آوردن مقدار کمتر TBA نقش داشته باشد (۳۲). فیلم ها و پوشش های خوراکی قابلیت کند کردن نفوذ رطوبت، اکسیژن، مواد فرار و محلول را دارند که از این مسیر می توانند در کاهش اکسیداسیون موثر باشند، همچنین می توان این خصوصیات را با افزودن موادی مانند آنتی-اکسیدان ها، مواد ضد میکروبی، مواد رنگی، طعم دهنده ها، ادویه ها و ... در ساختار فیلم، افزایش داد (۳۳).

#### ۴-۴- شاخص های میکروبی (باکتری های سرماگرا و سودوموناس ها):

اسانس مرزنجوش به خاطر مشتقات فنلی مانند کارواکرول و تیمول دارای فعالیت ضد میکروبی گسترده ای می باشد و یکی از مؤثرترین اسانس ها در رابطه با کنترل رشد میکروارگانیسم ها به حساب می آید. مطابق با یافته های Kurita و Koike (۱۹۸۳) اثر آنتی میکروبی اسانس مرزنجوش مربوط به فنل، الکل ها، آلدئیدها، کتونها، استرها و هیدروکربن های موجود در ترکیبات آن است (۲۶). باکتری های سرمادوست گرم منفی گروه اصلی میکروارگانیسم های عامل فساد ماهی نگهداری شده در دماهای سرد هستند (۶). باکتری های سرماگرا و عمدتاً گونه های سودوموناس آنزیم های لیپاز و فسفولیپاز تولید می کنند که سبب افزایش اسیدهای چرب آزاد می شوند. حد مجاز این باکتری ها در طول دوره ذخیره سازی ۷ (لگاریتم تعداد کلونی در گرم نمونه) است (۲۱). در مطالعه ی حاضر تعداد باکتری های سرماگرا و سودوموناس با افزایش زمان نگهداری افزایش یافت. همچنین میزان باکتری های سرماگرا در بین تیمارها دارای تفاوت معنی دار بود و با افزایش زمان نگهداری به طور معنی داری افزایش یافت ( $P < 0.05$ ). در روز ۱۴ نگهداری، این میزان در فیله شاهد به  $7/40 \pm 0/06$  لگاریتم تعداد کلونی در گرم نمونه که بالاتر از حد مجاز توصیه شده برای ماهی خام بود و در فیله پوششی کیتوزان  $6/22 \pm 0/10$  لگاریتم تعداد کلونی در گرم نمونه افزایش یافت، اما در نمونه پوششی کیتوزان و اسانس مرزنجوش این میزان به حدود  $5/74 \pm 0/08$  لگاریتم تعداد کلونی در گرم نمونه افزایش پیدا کرد. میزان اولیه باکتری های سودوموناس در روز صفر نگهداری در فیله شاهد و فیله های تیمار شده  $2/27 \pm 0/16$  لگاریتم تعداد کلونی در گرم نمونه بود که تفاوت معنی داری بین تیمارها مشاهده نشد. با گذشت زمان مقدار سودوموناس ها در روز صفر در فیله قزل آلا در فیله شاهد تا حدود  $5/88 \pm 0/21$  لگاریتم تعداد کلونی در گرم نمونه در روز ۱۴ افزایش یافت، در حالی که این میزان در تیمار پوششی کیتوزان حدود  $4/91 \pm 0/24$  مشاهده شد و کمترین میزان سودوموناس مربوط به تیمار

گزارش شد، به طوری که در روز ۱۶ نگهداری در تیمار شاهد و کازئینات سدیم بیش از حد مجاز، اما در تیمارهای حاوی اسانس آویشن این میزان کمتر از حد مجاز به دست آمد و با توجه به اینکه در تیمار شاهد و تیمار پوششی کازئینات هر دو خارج از محدوده ی مجاز بودند، دلیل این امر را به خواص آنتی باکتریایی آویشن نسبت دادند (۴، ۵). Bensid و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی اثر عصاره های آویشن، مرزنجوش و میخک بر پارامترهای کیفی ماهی کولی (*Engraulis encrasicolus*) در طول ذخیره سازی در یخ گزارش کردند (۸) که مقدار TVB-N برای ماهی های کولی ذخیره شده در یخ با عصاره آویشن، مرزنجوش و میخک پس از ۱۲ روز قابل قبول (کمتر از ۳۰ میلی گرم نیترژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهی) بود و دارای اختلاف معنی دار با تیمار شاهد بود ( $P < 0.05$ ). نتایج تحقیق موسوی و نسب و همکاران (۱۳۹۲) نیز نشان داد که اسانس فلفل سیاه و کیتوزان اثر سینرژیستی فراوانی در کاهش شمارش باکتری های کل، باکتری های سرمادوست، باکتری های اسیدلاکتیک و اینتروباکترها دارند. همچنین این دو ترکیب منجر به کاهش میزان بازهای از ته فرار در نمونه های پوشش دار شدند (۶). Ramezani و همکاران (۲۰۱۵)، گزارش کردند که پوشش کیتوزان و نانوکیتوزان برای حفاظت از فیله ماهی کپور نقره ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) در دمای ۴ درجه سانتی گراد موثر بود، البته نانوکیتوزان فعالیت ضد میکروبی بالاتر از کیتوزان نشان داد و توانایی بیشتری در مهار مقادیر TVB\_N در طول دوره نگهداری در یخچال داشت، غوطه ورسازی فیله های کپور در محلول کارواکرول/تیمول، موجب افزایش ماندگاری فیله از ۴ روز به حداقل ۱۲ روز گردید و مقادیر برای فیله های کپور غوطه ور شده در محلول  $0/5(7/7)$  درصد تیمول و کارواکرول، بعد از ۱۲ روز نگهداری در دمای ۵ درجه سانتی گراد ۳۰ میلی گرم نیترژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهی گزارش کردند (۴۰)، در حالیکه تیمار شاهد تنها بعد از ۴ روز به این مقدار رسید (۲۹).

### ۵- نتیجه گیری

با توجه به تقاضای مصرف کنندگان برای دسترسی به مواد غذایی با کیفیت بالا و نگرانی آن‌ها به دلایل مشکلات ناشی از مصرف نگهدارنده‌های مصنوعی و نیز نگرانی‌های زیست‌محیطی ناشی از تجمع پلیمرهای مصنوعی، تکنولوژی استفاده از پوشش‌های زیست‌تخریب‌پذیر با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی بالا می‌تواند جایگزین مناسبی باشد. با توجه به تحقیق حاضر می‌توان گفت اضافه کردن ۰/۵ درصد اسانس مرزنجوش به پوشش کیتوزان به دلیل داشتن خواص آنتی‌باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی موجب بهبود پارامترهای بیوشیمیایی و میکروبی در طول دوره ۲۱ روزه نگهداری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نگهداری‌شده در دمای یخچال می‌گردد، به طوری که روند فساد بیوشیمیایی و میکروبی در فیله‌های پوشش داده شده با کیتوزان غنی‌شده با ۰/۵ درصد اسانس مرزنجوش نسبت به نمونه شاهد کاهش یافت و پس از آن تیمار پوششی ۲ درصد کیتوزان بدون اسانس در شرایط بهتری نسبت به شاهد قرار داشت.

### ۶- منابع

۱. آمارنامه دریایی ایران، ۱۳۹۴. معاونت علمی و فناوری ستاد توسعه فناوری و صنایع دانش بنیان دریایی. ۱۰۶ص.
۲. اجاق، س.م. ۱۳۸۹. تأثیر استفاده از پوشش نگهدارنده کیتوزان غنی‌شده با اسانس دارچین بر کیفیت و ماندگاری فیله سرد شده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). رساله دکتری، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی. دانشگاه تربیت مدرس. ۱۰۷ صفحه
۳. اعتمادی، ح. ۱۳۸۷. پتانسیل آنتی‌باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی عصاره رزماری (*Rosmarinus officinalis*) در افزایش عمر ماندگاری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، فصلنامه علوم و صنایع غذایی، دوره ۵، شماره ۴، صفحات ۶۷-۷۷

پوششی کیتوزان و اسانس به میزان  $0.06 \pm 0.31$  لگاریتم تعداد کلونی در گرم نمونه بود. نمونه‌های پوششی با کیتوزان-مرزنجوش بار باکتریایی کمتری داشتند و اثر بازدارندگی بهتری نشان دادند. زرگر (۱۳۹۰) در بررسی تأثیر پوشش نگهدارنده خوراکی کازئینات سدیم غنی‌شده با اسانس آویشن شیرازی بر کیفیت و ماندگاری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نگهداری‌شده در یخچال گزارش کردند که در پایان مدت ذخیره‌سازی (۲۰ روز)، شمارش باکتری‌های کل دو تیمار کازئینات محتوی ۰/۵ و ۱ درصد اسانس آویشن، با اختلاف معنی‌داری کمتر از سایر تیمارها قرار داشتند (۴). در بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و آنتی-باکتریایی عصاره‌های مرزنجوش، چای سبز، مریم‌گلی و برگ‌بو با دوز ۰/۳ و ۰/۶ درصد بر کیفیت برگر ماهی منجمد ماکرل (*Scomber japonicus*) مشخص شد که شمارش باکتری‌های کل در برگر ماهی برای همه تیمارهای حاوی اسانس در طول دوره ذخیره‌سازی از حد مجاز تجاوز نمی‌کند. در میان تیمارهای حاوی اسانس نیز تفاوت معنی‌دار مشاهده شد ( $P < 0.05$ ) و به‌طور کلی در میان عصاره‌ها، عصاره مرزنجوش (۰/۶ درصد) در کنترل رشد میکروارگانیسم‌ها موثرتر بود. در این تحقیق استفاده از عصاره در دوز ۰/۶ درصد نسبت به دوز ۰/۳ درصد، منجر به رشد پایین‌تر باکتری در برگر ماهی شد. تعداد باکتری‌هایسرم‌اگرا (TPC) نیز در تیمارهای برگر ماهی حاوی عصاره مرزنجوش (۰/۶ درصد) و پس از آن عصاره چای سبز ۰/۶ درصد کاهش بیشتری را نشان داده است ( $P < 0.05$ ; ۳۶). مطالعه‌ی اجاق و همکاران (۱۳۸۹)، با استفاده از پوشش نگهدارنده کیتوزان غنی‌شده با اسانس دارچین در غلظت-های کیتوزان (۲درصد) و اسانس (۰، ۰/۴، ۰/۸ و ۱/۵ و ۲ درصد) بر کیفیت و ماندگاری فیله سرد شده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که تیمارهای پوششی مخصوصا تیمارهای با پوشش اسانس تفاوت معنی‌داری از نظر آنالیزهای میکروبی، با تیمار شاهد داشتند (۲).

- in Food Science and Nutrition, 44(4):223-237.
12. Didry, N., Dubreuil, L. and Pinkas, M. 1993. Antibacterial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination." Journal Article, 48: 301-304.
  13. Dorman, H.J.D. and Deans S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology, 88: 308-316.
  14. Dragland, S., Senoo, H., Wake, K., Holte, K. and Blomhoff, R. 2003. Several Culinary and Medicinal Herbs Are Important Sources of Dietary Antioxidants. Human Nutrition and Metabolism, 133: 1286-1290.
  15. Economou, K.D., Oreopoulou, V. and Thomopoulos C.D. 1991. Antioxidant activity of some plant extracts of the family labiatae. Journal of the American Oil Chemists Society, 68 (2): 109-113.
  16. Egan, H., Kirk, R.S. and Sawyer, R. 1997. Pearson's chemical analysis of food, 9th Edition Longman Scientific and Technica, pp: 609-634.
  17. Fan, W., Sun, J., Chen, Y., Qiu, J., Zhang, Y., and Chi, Y. 2009. Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. Food Chemistry, 115(1): 66-70.
  18. Fernández-Saiz, P., Sánchez, G., Soler, C., Lagaron, J.M. and Ocio, M.J. 2013. Chitosan films for the microbiological preservation of refrigerated sole and hake fillets. Food Control, 34(1): 61-68.
  19. Gomes, H.A., Silva, E.N., Nascimento, M.R.L. and Fukuma, H.T. 2003. Evaluation of the 2-thiobarbituric acid method for the measurement of lipid oxidation in mechanically deboned gamma irradiated chicken meat. Food Chemistry, 80: 433 – 437.
  20. Goulas, A.E. and Kontominas, M.G. 2005. Effect of salting and smoking-method on the keeping quality of chub mackerel (*Scomber japonicus*): biochemical and sensory attributes. Food Chemistry, 93(3): 511-520.
  21. Hamzeh, A. and Rezaei, M. 2011. Antioxidant and antibacterial effects of زرگر، م. ۱۳۹۰، تأثیر پوشش نگهدارنده خوراکی کازئینات سدیم غنی شده با اسانس آویشن شیرازی بر کیفیت و ماندگاری ماهی قزل آلای رنگین کمان نگهداری شده در یخچال، پایان نامه ی کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری. ۷۲ صفحه.
  ۵. زرگر، م.، یگانه، س.، رضوی، س.ه. و اجاق، م. ۱۳۹۳. تأثیر پوشش خوراکی کازئینات سدیم بر کیفیت ماهی قزل آلای رنگین کمان طی نگهداری در یخچال. فصلنامه علوم و صنایع غذایی، شماره ۴۴، دوره ۱۱، صفحه ۸۱-۷۱.
  ۶. موسوی نسب، م.، گلمکانی، م.ت.، ضیایی، ا.، عزیزی نیا، م.، شاد، ا. و یوسف آباد، م.ح. ۱۳۹۲. اثر پوشش تهیه شده از کیتوزان و اسانس فلفل سیاه بر خصوصیات میکروبی و فیزیکوشیمیایی ماهی کپور معمولی. بیست و یکمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی، ۶ صفحه
  7. Aider, M. 2010. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. LWT-Food Science and Technology, 43: 837-842.
  8. Bensid, A., Ucar, Y., Bendeddouche, B. and Özogul, F. 2014. Effect of the icing with thyme, oregano and clove extracts on quality parameters of gutted and beheaded anchovy (*Engraulis encrasicolus*) during chilled storage. Food chemistry, 145: 681-686.
  9. Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223-253.
  10. Cagri, A., Ustunol, Z. and Ryser, E.T. 2004. Antimicrobial edible films and coatings. Journal of Food Protection, 67(4): 833-848.
  11. Cha, D.S. and Chinnan, M.S. 2004. Biopolymer-based antimicrobial packaging: a review. Critical Reviews

- during chilled storage. *Food Hydrocolloids*, 26(1): 167-174.
31. Namulema, A., Muyonga, J.H. and Kaaya A.N. 1999. Quality deterioration in frozen Nile perch (*Lates niloticus*) stored at -13 and -27°C, *Food Research International*, 32: 151-156.
  32. Negi, P.S. 2012. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*, 156(1): 7-17 .
  33. Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H. and Hosseini S.M.H. 2010. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, 120: 193-198.
  34. Olafsdottir, G, Martinsdóttir, E, Oehlenschläger, J, Dalgaard, P., Jensen, B., Undeland, I., et al., 1997. Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends in Food Science & Technology*, 8(8): 258-265.
  35. Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L. and Lacroix, M. 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18(5): 414-420.
  36. Ozogul, Y. and Uçar, Y. 2013. The effects of natural extracts on the quality changes of frozen chub mackerel (*Scomber japonicus*) burgers. *Food and Bioprocess Technology*, 6(6): 1550-1560.
  37. Özyurt, G., Kuley, E., Özkütük, S. and Özogul, F. 2009. Sensory, microbiological and chemical assessment of the freshness of red mullet (*Mullus barbatus*) and goldband goatfish (*Upeneus moluccensis*) during storage in ice. *Food chemistry*, 114(2): 505-510.
  38. Peniche, C., Argüelles-Monal, W. and Goycoolea, F.M. 2008. Chitin and chitosan: major sources, properties and applications. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, 517-542.
  - sodium alginate coating enriched with thyme essential oil on rainbow trout fillets during refrigerated storage. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 6(3): 11-20.
  22. Harpaz, S., Glatman, L., Drabkin, V. and Gelman, A. 2003. Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwater-reared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). *Journal of Food Protection*, 66(3): 410-417.
  23. Higdon, J.V. and Frei, B. 2003. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(1): 89-143
  24. Jeon, Y.J., Kamil, J.Y. and Shahidi, F. 2002. Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(18): 5167-5178.
  25. Kaitaranta, J.K. 1992. Control of lipid oxidation in fish oil with various antioxidative compounds. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 69(8): 810-813.
  26. Kurita, N. and Koike, S. 1983. Synergistic antimicrobial effect of ethanol, sodium chloride, acetic acid and essential oil components. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47(1): 75-67.
  27. López, P., Sanchez, C., Batlle, R. and Nerin, C. 2007. Vapor-Phase Activities of Cinnamon, Thyme, and Oregano Essential Oils and Key Constituents against Foodborne Microorganisms. *Food Chemistry*, 55(11): 4348-4356.
  28. Mac Faddin, J.F. 1997. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*, Williams & Wikins Co. pp. 312.
  29. Mahmoud, B.S.M., Yamazaki, K., Miyashita, K., Shin, S. and Suzuki, T. 2004. Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds. *Food Microbiology*. 21: 657 – 666.
  30. Mohan, C.O., Ravishankar, C.N., Lalitha, K.V. and Srinivasa Gopal, T.K. 2012. Effect of chitosan edible coating on the quality of double filleted Indian oil sardine (*Sardinella longiceps*)

- (*Oncorhynchus gorbuscha*) fillets during frozen storage. *Journal of Food Engineering*, 83(3): 366-373.
43. Wang, C. and Shelef, L.A. 1992. Behavior of *Listeria monocytogenes* and the spoilage microflora in fresh cod fish treated with lysozyme and EDTA. *Food microbiology*, 9(3): 207-213.
44. Yanishlieva, N.V., Marinova, E.M., Gordon, M.H. and Raneva, V.G. 1999. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*, 64(1): 59-66.
45. Yasin, N.M.N. and Abou-Taleb, M. 2007. Antioxidant and antimicrobial effects of marjoram and thyme in coated refrigerated semi fried mullet fish fillets. *World J. Dairy Food Sci*, 2: 1-9.
39. Rahimabadi, E.Z. and Divband, M. 2012. The effects of coating and *Zataria multiflora* Boiss essential oil on chemical attributes of silver carp fillet stored at 4°C. *International food research journal*, 19(2): 685-690.
40. Ramezani, Z., Zarei, M. and Raminnejad, N. 2015. Comparing the effectiveness of chitosan and nanochitosan coatings on the quality of refrigerated silver carp fillets. *Food Control*, 51: 43-48.
41. Rezaei, M. and Hosseini, S.F. 2008. Quality assessment of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chilled storage. *Journal of Food science*, 73(6): 93-96.
42. Sathivel, S., Liu, Q., Huang, J. and Prinyawiwatkul, W. 2007. The influence of chitosan glazing on the quality of skinless pink salmon